

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-34293

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)2月3日

C 12 P 7/60

C 12 N 1/20

C 12 P 41/00

7236-4B

A-8515-4B

7823-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 19 (全10頁)

⑭ 発明の名称 発酵方法

⑮ 特 願 昭63-27374

⑯ 出 願 昭63(1988)2月8日

優先権主張 ⑰ 1987年2月7日 ⑱ 中国(CN) ⑲ 87100547

⑳ 発 明 者 イン グアング リン 中国北京海淀区中グアン村北一条13号 中国科学院微生物研究所気付

㉑ 発 明 者 タオ ゼング シン 中国北京海淀区中グアン村北一条13号 中国科学院微生物研究所気付

㉒ 発 明 者 マン ジ セング 中国北京海淀区中グアン村北一条13号 中国科学院微生物研究所気付

㉓ 出 願 人 中国科学院微生物研究所 中国北京海淀区中グアン村北一条13号

㉔ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

発酵方法

2. 特許請求の範囲

(1) 微生物によるL-ソルボースの変換によつて2-ケト-L-グルコン酸を製造する方法において、Gluconobacter oxydans と Bacillus megaterium からなる微生物の混合培養物を用いることを特徴とする方法

(2) 使用する微生物 Gluconobacter oxydans は以下の特性を有する特許請求の範囲第1項に記載の方法：

- a) 2-ケト-L-グルコン酸をソルボースから産生する、
- b) エタノールを酢酸に酸化する、
- c) D-グルコースをD-グルコン酸と2-ケト-D-グルコン酸に酸化する、
- d) ポリアルコールからケトン体の生成、
- e) マニトールブイオン中pH4および5での(24時間培養)線膜および環状増殖、ならびに

グルコースブイオン中pH4.5での薄膜増殖

(3) 使用する微生物 Gluconobacter はさらに以下の特性を有する特許請求の範囲第1項または第2項のいずれか一つに記載の方法：

- f) グリセロールはジヒドロオキシアセトンに酸化しない、
- g) 2-ケト-D-グルカン酸をソルビトールおよびグルカン酸から産生するが、グルコース、フラクトース、グルコン酸、マニトールまたは2-ケト-D-グルコン酸からは産生しない、
- h) 多形性で、外観的に鞭毛を認めない、
- i) フラクトースから褐色色素を生成する、
- j) Bacillus megaterium またはその細胞抽出物の存在下に共培養すると良好な生育を示す、
- k) ストレプトマイシン感受性

(4) 培養微生物第2980号(DSM No. 4027)もしくはその機能的に均等な培養微生物またはその二次培養体、突然変異体もしくは変異体を使用する特許請求の範囲第1項、第2項または第3項のいずれか一つに記載の方法

(5) 濃度約20～約200g/l、好ましくは約50～約100g/lでソルボース基質を使用する特許請求の範囲第1項から第4項までのいずれか一つに記載の方法

(6) 2-ケトー-レ-グルン酸は少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率で産生される特許請求の範囲第5項に記載の方法

(7) pH約5～8、好ましくは約6～8で行われる特許請求の範囲第1項から第6項までのいずれか一つに記載の方法

(8) 温度約25～35℃、好ましくは30±1℃で行われる特許請求の範囲第1項から第7項までのいずれか一つに記載の方法

(9) *Gluconobacter oxydans* 種および *Bacillus megaterium* 種の微生物からなる混合微生物培養物

(10) 微生物 *Gluconobacter oxydans* は以下の特性を有する特許請求の範囲第9項に記載の微生物培養物

j) *Bacillus megaterium* またはその細胞抽出物の存在下に共培養すると良好な生育を示す、

k) ストレプトマイシン感受性

(12) L-ソルボースから少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率での2-ケトー-レ-グルン酸産生能を有する特許請求の範囲第9項から第11項までのいずれか一つに記載の微生物培養物

(13) 培養微生物第2980号(DSM No 4027)の特性を有する培養微生物およびその機能的に均等な培養微生物、またはその二次培養体、突然変異体もしくは変異体

(14) 特許請求の範囲第2項および第3項に掲げた特性を示す *Gluconobacter oxydans* 微生物

(15) 適当な *Bacillus megaterium* 培養物と一緒に培養混合物の形で、L-ソルボースから少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率での2-ケトー-レ-グルン酸産生能を有す

a) 2-ケトー-レ-グルン酸をソルボースから産生する、

b) エタノールを酢酸に酸化する、

c) D-グルコースをD-グルコン酸と2-ケトー-D-グルコン酸に酸化する、

d) ポリアルコールからケトン体の生成

e) マニトールブイヨン中pH4および5での(24時間培養) 菌膜および菌状増殖、ならびにグルコースブイヨン中pH4、5での菌膜増殖

(11) 微生物 *Gluconobacter oxydans* はさらに以下の特性を有する特許請求の範囲第9項または第10項のいずれか一つに記載の微生物培養物

f) グリセロールはジヒドロオキシアセトンに酸化しない、

g) 2-ケトー-D-グルカン酸をソルビトールおよびグルカン酸から産生するが、グルコース、フラクトース、グルコン酸、マニトールまたは2-ケトー-D-グルコン酸からは産生しない、

h) 多形性で、外観的に鞭毛を認めない、

i) フラクトースから褐色色素を生成する、

ることを特徴とする *Gluconobacter oxydans* 微生物

(16) DSM No 4025株(CGMCC No 0119)の特性を有する微生物、ならびにその機能的均等物、二次培養体、突然変異体および変異体

(17) 適当な *Gluconobacter oxydans* 培養物と一緒に培養混合物の形で、L-ソルボースから少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率での2-ケトー-レ-グルン酸産生能を有することを特徴とする培養 *Bacillus megaterium*

(18) DSM No 4026株(CGMCC No 0120)の特性を有する微生物、ならびにその機能的均等物、二次培養体、突然変異体および変異体

(19) 特許請求の範囲第1項から第8項までのいずれか一つに記載の方法によつて製造された2-ケトー-レ-グルン酸を出発原料として使用することを特徴とするアスコルビン酸の製造方法

3. 発明の詳細な説明

本発明は、発酵方法、すなわち発酵によつて2

ーケトーレーグロン酸を製造する方法に関する。さらに、本発明は、このような方法に使用できるある種の微生物に関する。

2-ケトーレーグロン酸はアスコルビン酸の製造に重要な中間体であり、よく知られている Reichstein法に従ってアスコルビン酸に変換できる。

D-ソルビトールまたはL-ソルビトールから2-ケトーレーグロン酸の発酵による製造は公知である。

すなわち、日本特許出願公告第51-40154号には、*Acetobacter*, *Bacterium* または *Pseudomonas* 属の微生物によるD-ソルビトールから2-ケトーレーグロン酸の製造が開示されている。これらの微生物は、好気的条件下にD-ソルビトールを酸化し、2-ケトーレーグロン酸を産生できる。しかしながら、この公知の方法の収率はかなり低く、すなわち6g/l以下である。

Acta Microbiologica Sinica, 21(2), 185~191 (1981) に開示されている他の

公知方法によれば、2-ケトーレーグロン酸は、*Pseudomonas striata* と *Gluconobacter oxydans* からなる微生物混合培養物により、ソルボースから、ソルボースの濃度70g/lで開始したときは30g/lの収率で、またソルボース濃度100g/lで開始したときは37g/lの収率で製造できるとされている。

本発明によれば、L-ソルボースから2-ケトーレーグロン酸をさらに高収率で製造することが可能である。すなわち、ソルボース濃度70g/lで開始したときは40g/l、また50g/l以上の収率さえ可能であり、さらに濃度を高めればさらに高収率が達成される。

微生物を用いてL-ソルボースを変換させることによる本発明の2-ケトーレーグロン酸の製造方法は、*Gluconobacter oxydans* と *Bacillus megaterium* からなる微生物混合培養物を用いることを特徴とするものである。

これらの2種の微生物の第一のものを、本発明者らは、*Bergey's Manual of Determinative*

Bacteriology、第8版、1974を参照し、とくに以下の特性：

a) 2-ケトーレーグロン酸をソルボースから産生する、

b) エタノールを酢酸に酸化する、

c) D-グルコースをD-グルコン酸と2-ケト-D-グルコン酸に酸化する、

d) ポリアルコールからケトン体の生成、

e) マニトールブイヨン中pH4および5での(24時間培養)薄膜および環状増殖、ならびにグルコースブイヨン中pH4.5での薄膜増殖を示す事実から、*Gluconobacter oxydans* と命名し、分類した。

上述のほか、この微生物は、さらに以下の性質を示す。

f) グリセロールはジヒドロオキシアセトンに酸化しない、

g) 2-ケト-D-グルコン酸をソルビトールおよびグルコン酸から産生するが、グルコース、フラクトース、グルコン酸、マニトールまたは2

ーケト-D-グルコン酸からは産生しない、

h) 多形性で、外観的に鞭毛を認めない、

i) フラクトースから褐色色素を生成する、

j) *Bacillus megaterium* またはその細胞抽出

物の存在下に共培養すると良好な生育を示す、

k) ストレプトマイシン感受性。

これらの2種の微生物の第二のものは、それが、形態学的、生理学的、培養的に、またその他の点で *Bacillus megaterium* に典型的な特性を示すことから分類された。

天然源から単離されるかまたは好適に利用できる寄託機関から得られる、一方は *Gluconobacter oxydans* 種、他方は *Bacillus megaterium* 種に属する任意の株が、それらが混合培養の形でL-ソルボースを満足できる収率、すなわち40g/l以上、とくに少なくとも50g/l以上、さらには少なくとも80g/lの収率において2-ケトーレーグロン酸に変換できることを条件に、本発明のために使用するのに有用である。

2-ケトーレーグロン酸を製造する本発明の方法に使用することが好ましい混合培養物は、培養

微生物第2980号もしくはその機能的に均等な培養物またはその二次培養体、突然変異体もしくは変異体である。培養微生物第2980号はDSM第4027号としてDeutsche Sammlung von Mikroorganismen (Göttingen, なおDeutsche Sammlung von Mikroorganismenの現在の所在地はMascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, Federal Republic of Germany)に1987年3月17日付で寄託された。

この混合培養物は、前述のa)~k)の特性を示すGluconobacter oxydans株、およびBacillus megaterium株から構成される。

特定の好ましいGluconobacter oxydans株(Academia Sinicaの内部記号As-1.945)は、the Center for General Microbiological Culture Collection, Institute of Microbiology, Zhong Guan Cun, Beijing, ChinaにCGMCC第0119号として1987年2月7日に寄託された。この株の二次培養体は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

(Göttingen)にDSM第4025号として1987年3月17日に寄託されている。

特定の好ましいBacillus megaterium株(Academia Sinicaの内部記号As-1.1484)は、the Center for General Microbiological Culture Collection, Institute of Microbiology, Zhong Guan Cun, Beijing, ChinaにCGMCC第0120号として1987年2月7日に寄託された。この株の二次培養体は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Göttingen)にDSM第4025号として1987年3月17日に寄託されている。

Gluconobacter oxydans株およびBacillus megaterium株、両者の細胞は、両端が丸い棒状をしている。Gluconobacter oxydans株の細胞の直径は平均約0.3~0.6 μ m、その長さは約0.9~1.6 μ m、主として1~1.5 μ mである。Bacillus megaterium株の細胞の直径は平均約1 μ m~1.5 μ m、その長さは約2.0~5.0、主として4 μ mである。2種の株は上述

の大きさによつて容易に識別できる。

発酵法開始時におけるBacillusコロニーとGluconobacterコロニーの量的比率にはとくに限定はない。この比はたとえば1:10~1:300(Bacillus:Gluconobacter)とすることができる。この比は発酵法の過程でそれ自体、至適の値に自動的に調整される。

本発明による2-ケート-1-グロン酸の製造は、L-ソルボースならびに適当な栄養素を含有するメジウム中で上述の混合微生物培養物を培養することによつて行われる。別法として、本発明の方法は、上述の混合微生物を培養し、ついでその培養物から集めた全細胞または細胞を含まない抽出物を、L-ソルボースと接触させることによつても実施できる。

混合微生物を、L-ソルボースおよび適当な栄養素を含むメジウム中で培養する場合、水性メジウム中好気条件下に微生物を培養するのが便利である。

本発明の発酵方法は、約5~8のpH、好ましく

は約6~8のpHで実施できる。

本発明の発酵方法を実施するのに好ましい温度範囲は約25°~35℃である。本発明の発酵方法はさらに好ましくは30°±1℃で行われる。

発酵時間は、使用するpH、温度および栄養培地に依存して変化するが、通常は0.5~10日間で好ましい結果がもたらされる。

本発明の方法において出発原料として用いられるL-ソルボース懸濁液の濃度は、約20~200g/l、好ましくは約50~約100g/lの間で変化させることができる。

本発明の発酵方法に使用される培養メジウムは、通常、同化可能な炭素源、消化可能な窒素源ならびに無機物質、ビタミン、微量元素および他の生長促進因子のような、微生物の栄養素を含有する。本発明の方法において出発原料として用いられるL-ソルボースのほかに、炭素源となる他の物質、たとえばグリセロール、グルコース、マニトール、フラクトース、D-アラビトール等も添加することができる。

本発明の方法においては、窒素源として各種の有機または無機物質、たとえば酵母エキス、肉エキス、ペプトン、カゼイン、コーンステイアリカー、尿素、アミノ酸、硝酸塩、アンモニウム塩等を使用できる。無機物質としては、硫酸マグネシウム、リン酸カリウム、塩化第一鉄および第二鉄、炭酸カルシウム等を使用できる。

培養物から集めた予め生育させた全細胞を使用する場合は、微生物の培養は上述したのと同ーまたは類似の条件下に行われる。これらの全細胞は好気条件下、水性メジウム中で用いられ、その他の(出発原料として用いられるレーソルボース以外の)栄養素は必要ない。

培養物からの細胞を含まない抽出物を使用する場合は、これらの抽出物は水性メジウム中基質に添加され、上述の方法と同様にして好気条件下にレーソルボースを2-ケートーレーグロン酸へ変換するのに用いられ、その他の栄養素はこの場合も必要ではない。

本発明の方法によれば、2-ケートーレーグロン

酸は、少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率で製造することができる。

本発明の方法によつて得られる2-ケートーレーグロン酸は反応混合物から、たとえば塩の形成によりまたは生成物と周囲の不純物との間の性質たとえば溶解度、吸着性および溶媒間の分配係数の差を用いて単離できる。たとえばイオン交換樹脂への吸着は生成物の単離に有利な手段である。かくして得られた生成物はさらに慣用方法により、たとえば再結晶またはクロマトグラフィーによつて精製できる。

別法として、反応混合物を直接エステル化、ついでエノール化およびラクトン化してレーアスコルビン酸に変換することもできる。

本発明はまた、上述の方法に使用でき、*Gluconobacter oxydans* 種および *Bacillus megaterium* 種の微生物からなることを特徴とする混合微生物培養物に関する。

上記方法に有用であるためには、上記種は個別

ではなく混合培養物の形で使用されることが必要である。

本発明における好ましい混合微生物培養物は、培養微生物第2980号もしくはその機能的に均等な培養物、またはその二次培養体、突然変異体もしくは変異体である。培養微生物第2980号はDSM第4027号として、Deutsche Sammlung und Mikroorganismen(Göttingen)に1987年3月17日付で寄託されている。

本発明における混合微生物培養物は、レーソルボースから2-ケートーレーグロン酸を、少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率で産生する能力によつて特徴づけられる。

すなわち、培養物第2980号(DSM第4027号)の二次培養体、突然変異体または変異体のような他の培養物に関連して用いられる「機能的に均等な」の語は、レーソルボースから2-ケートーレーグロン酸を、40g/l以上、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少な

くとも80g/lの収率で産生することができる培養物を意味する。

本発明はまた、混合微生物培養物の個々の成分、すなわち、配合すると混合培養物として上述の要求すなわちレーソルボースを2-ケートーレーグロン酸へ40g/l以上、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは80g/lの収率での変換に合致できる一方では*Gluconobacter oxydans* 培養物、他方では*Bacillus megaterium* 培養物に関する。

このような培養物の代表的なものは、

- 1) *Gluconobacter oxydans* 培養物 A s 1.945 (Academia Sinica 内部記号): the Center for General Microbiological Culture Collection, Institute of Microbiology, Zhong Guan Cun, Beijing, China に CGMCC 第0119号として1987年2月7日付で寄託、その二次培養体はDeutsche Sammlung von Mikroorganismen(Göttingen)にDSM第4025号として1987年3月17日付で寄託されて

いる、

2) *Bacillus megaterium* 培養物 A S
1. 1484 (Academia Sinica 内部記号) : the
Center for General Microbiological Culture
Collection, Institute of Microbiology, Zhong
Guan Cun, Beijing, China に CGMCC 第 01
20 号として 1987 年 2 月 7 日付で寄託、その
二次培養体は Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen (Göttingen) に DSM 第 402
6 号として 1987 年 3 月 17 日付で寄託されて
いる。

このような培養物の代表としてはさらに、機能的に均等な培養物、たとえばその二次培養体、突然変異体および変異体を挙げることができる。

突然変異体は、母株から慣用方法たとえば紫外線、X 線および γ 線照射により、または適当な突然変異原により誘導できる。

次に本発明を以下の実施例により例示する。

例 1

15 l の実験用発酵装置中での発酵

インキュベーションしたのち、フラスコを集めた。この合したブイヨン 1.4 l を用い、以下の組成を有するメジウム 9 l を含有するジャーファーマンターに接種した。

製造メジウム

1 %	コーンステイープリカー
0.1 %	KH_2PO_4
0.01 %	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.5 %	CaCO_3
8 %	Ｌ－ソルボース
1.5 %	尿素

脱イオン水を加えて 1 l とする

滅菌後 pH は 7.6 ~ 8.0 の範囲である。

発酵中の通気は 1 vvm、攪拌は 500 RPH、温度は 30℃ にセットした。

4.6 時間後、最初 70 g/l (接種後) であつた L-ソルボース濃度は 0 となり、一方、2-KGA の濃度は 60 g/l に達した。

もつと L-ソルボース濃度を高くして発酵を始めると、もつと高い収率が得られる。

Gluconobacter oxydans および *Bacillus megaterium* の混合培養物を、種培養メジウム (下記) の成分を 2% アガールとともに含有するペトリ皿のアガール上に面培養した。

30℃ で 4 日間インキュベーション後、アガール表面上に細胞サスパンションが生成した。これを用い、以下のメジウム各 400 ml を含有する 4 個の旋回フラスコに接種した。

0.3 %	酵母エキス
0.3 %	牛肉エキス
0.3 %	コーンステイープリカー
1.0 %	ペプトン
0.1 %	KH_2PO_4
0.02 %	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.1 %	尿素
0.1 %	CaCO_3
2.0 %	Ｌ－ソルボース

脱イオン水を加えて 1 l とする

滅菌後 pH 6.5 とする。

30℃ において RPM 200 を用い、21 時間

例 2

製造メジウムには以下の組成

12 %	Ｌ－ソルボース
1.85 %	コーンステイープリカー
0.0086 %	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.086 %	KH_2PO_4
0.086 %	尿素
0.15 %	消泡剤 CA-115

を用い、3 l (許容容積 2 l) のジャーファーマンター中、通気速度 0.5 vvm、攪拌 800 r.p.m.、pH 7.0 で (Na_2CO_3 でコントロール)、温度 30℃ に例 1 の操作を改良した。

50 時間後、初期 110 g/l であつた L-ソルボース濃度は 20 g/l となり、2-KGA 濃度は 81 g/l であつた。

代理人 浅 村 昭

第1頁の続き

⑨Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 7/60
 C 12 R 1:01)
 (C 12 P 7/60
 C 12 R 1:11)
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:01
 1:11)
 (C 12 P 41/00
 C 12 R 1:01
 1:11)

6712-4B

優先権主張 ⑩1987年2月23日③欧州特許機構(E P)⑩87810169.0

⑫発明者 ニング ウェン ズ 中国 北京 ジアン グオ メン ワイ グアング ファ
 ル ベイ ジン ジ ヤオ チヤング (番地なし)
 ⑬発明者 ワング チヤング フ 中国 北京 ジアン グオ メン ワイ グアング ファ
 イ ル ベイ ジン ジ ヤオ チヤング (番地なし)
 ⑭発明者 ワング シュ デイン 中国 北京 ジアン グオ メン ワイ グアング ファ
 グ ル ベイ ジン ジ ヤオ チヤング (番地なし)

手続補正書 (自発)

昭和63年4月28日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第27374号

2. 発明の名称

発酵方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 中国科学院微生物研究所

4. 代理人

居所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
 新大手町ビルディング331
 電話(211)3651(代表)
 氏名 (6669) 浅井 木寸

5. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄
 発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容 別紙のとおり

- (1) 特許請求の範囲を別紙のごとく訂正する。
- (2) 明細書、7頁8行の「L-ソルビトール」を「L-ソルボース」に訂正する。
- (3) 同書、9頁下から5行の「グリセロールは」を「グリセロールを」に、下から4行の「酸化しない」を「実質的に酸化しない」に、下から3行および2行の「グルカン酸」を「グルカル酸」に、末行の「フラクトース」を「フルクトース」に訂正する。
- (4) 同書、10頁3行の「フラクトース」を「フルクトース」に、11~12行の「好適に利用できる」を「公的に入手可能な」に訂正する。
- (5) 同書、11頁2行および下から2行の「二次培養体」を「継代培養物」に、下から7行の「As=」を「AS」に訂正する。
- (6) 同書、12頁4行の「As=」を「AS」に、9行の「二次培養体」を「継代培養物」に、11行の「4025」を「4026」に訂正する。
- (7) 同書、13頁2行および3行の「コロニー」を「細胞」に、6行の「比」を「比率」に、10行

特許庁
 63. 4. 28

- および17行の「メジウム」を「培地」に、17～18行の「水性メジウム」を「液体培地」に、18行の「好気」を「好氣的」に訂正する。
- (8) 同書、14頁12行の「培養メジウム」を「培地」に、下から3行の「マニトール」を「マンニトール」に、下から2行の「フラクトース」を「フルクトース」に訂正する。
- (9) 同書、15頁11行および16行の「好気」をそれぞれ「好氣的」に、11行および15行の「水性メジウム」をそれぞれ「液体培地」に訂正する。
- (10) 同書、16頁8行の「たとえば」の前に「吸着、」を加入する。
- (11) 同書、17頁5行および下から5行の「二次培養体」をそれぞれ「継代培養物」に訂正する。
- (12) 同書、18頁4行の「配合すると」を「一方では *Gluconobacter oxydans* 培養物、他方では *Bacillus megaterium* 培養物に関し、それらは」に訂正し、8行～10行の「合致できる一方では………関する。」を「合致できる。」に訂正

を「初期に」に訂正する。

- する。
- (13) 同書、18頁12行の「AS」を「AS」に、下から3行の「二次培養体」を「継代培養物」に訂正する。
- (14) 同書、19頁2行の「AS」を「AS」に、8行および13行の「二次培養体」をそれぞれ「継代培養物」に訂正する。
- (15) 同書、20頁2行および7行の「メジウム」をそれぞれ「培地」に、3行、4行および5～6行の「アガール」をそれぞれ「寒天」に、6行の「細胞サスペンション………これ」を「生育した混合培養物」に訂正する。
- (16) 同書、21頁2行の「フィオン」を「フロス」に、3行の「メジウム」を「培地」に、5行の「製造メジウム」を「生産培地」に、下から5行の「最初」を「初期に」に、末行の「もつと」を「より」に訂正する。
- (17) 同書、22頁2行の「製造メジウム」を「生産培地」に、3行の「12%」を「12.0%」に、12行の「改良」を「変更」に、13行の「初期」

2. 特許請求の範囲

- (1) 微生物によるソーソルボースの変換によつて2-ケトーソーグロン酸を製造する方法において、*Gluconobacter oxydans* と *Bacillus megaterium* からなる微生物の混合培養物を用いることを特徴とする方法
- (2) 使用する微生物 *Gluconobacter oxydans* は以下の特性を有する特許請求の範囲第1項に記載の方法：
- 2-ケトーソーグロン酸をソーソルボースから産生する、
 - エタノールを酢酸に酸化する、
 - D-グルコースをD-グルコン酸と2-ケト-D-グルコン酸に酸化する、
 - ポリアルコールからケトン体の生成、
 - マニトールブイヨン中pH4および5での(24時間培養)静置および環状増殖、ならびにグルコースブイヨン中pH4.5での静置増殖
- (3) 使用する微生物 *Gluconobacter* はさらに以下の特性を有する特許請求の範囲第1項または第

2 項のいずれか一つに記載の方法：

f) グリセロールをジヒドロオキシアセトンに実質的に酸化しない、

g) 2-ケト-D-グルカル酸をソルビトールおよびグルカル酸から産生するが、グルコース、フルクトース、グルコン酸、マニトールまたは2-ケト-D-グルコン酸からは産生しない、

h) 多形性で、外観的に稜毛を認めない、

i) フルクトースから褐色色素を生成する、

j) *Bacillus megaterium* またはその細胞抽出物の存在下に共培養すると良好な生育を示す、

k) ストレプトマイシン感受性

(4) 培養微生物第2980号(DSM No 4027)もしくはその機能的に均等な培養微生物またはその継代培養物、突然変異体もしくは変異体を使用する特許請求の範囲第1項、第2項または第3項のいずれか一つに記載の方法

(5) 濃度約20〜約200g/l、好ましくは約50〜約100g/lでソルボース基質を使用する特許請求の範囲第1項から第4項までのいず

c) D-グルコースをD-グルコン酸と2-ケト-D-グルコン酸に酸化する、

d) ポリアルコールからケトン体の生成

e) マニトールフィオン中pH4および5での(24時間培養)薄膜および環状増殖、ならびにグルコースフィオン中pH4.5での薄膜増殖

(11) 微生物 *Gluconobacter oxydans* はさらに以下の特性を有する特許請求の範囲第9項または第10項のいずれか一つに記載の微生物培養物

f) グリセロールをジヒドロオキシアセトンに実質的に酸化しない、

g) 2-ケト-D-グルカル酸をソルビトールおよびグルカル酸から産生するが、グルコース、フルクトース、グルコン酸、マニトールまたは2-ケト-D-グルコン酸からは産生しない、

h) 多形性で、外観的に稜毛を認めない、

i) フルクトースから褐色色素を生成する、

j) *Bacillus megaterium* またはその細胞抽出物の存在下に共培養すると良好な生育を示す、

k) ストレプトマイシン感受性

れか一つに記載の方法

(6) 2-ケト-L-グルコン酸は少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率で産生される特許請求の範囲第5項に記載の方法

(7) pH約5〜8、好ましくは約6〜8で行われる特許請求の範囲第1項から第6項までのいずれか一つに記載の方法

(8) 温度約25〜35℃、好ましくは30±1℃で行われる特許請求の範囲第1項から第7項までのいずれか一つに記載の方法

(9) *Gluconobacter oxydans* 種および *Bacillus megaterium* 種の微生物からなる混合微生物培養物

(10) 微生物 *Gluconobacter oxydans* は以下の特性を有する特許請求の範囲第9項に記載の微生物培養物

a) 2-ケト-L-グルコン酸をソルボースから産生する、

b) エタノールを酢酸に酸化する、

(12) L-ソルボースから少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率での2-ケト-L-グルコン酸産生能を有する特許請求の範囲第9項から第11項までのいずれか一つに記載の微生物培養物

(13) 培養微生物第2980号(DSM No 4027)の特性を有する培養微生物およびその機能的に均等な培養微生物、またはその継代培養物、突然変異体もしくは変異体

(14) 特許請求の範囲第2項および第3項に掲げた特性を示す *Gluconobacter oxydans* 微生物

(15) 適当な *Bacillus megaterium* 培養物と一緒に培養混合物の形で、L-ソルボースから少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率での2-ケト-L-グルコン酸産生能を有することを特徴とする *Gluconobacter oxydans* 微生物

(16) DSM No 4025株(CGMCC No 011

9) の特性を有する微生物、ならびにその機能的均等物、継代培養物、突然変異体および変異体

(17) 適当な *Gluconobacter oxydans* 培養物と一緒に培養混合物の形で、L-ソルボースから少なくとも40g/l、好ましくは少なくとも50g/l、とくに好ましくは少なくとも80g/lの収率での2-ケト-L-グルロン酸産生能を有することを特徴とする培養 *Bacillus megaterium*

(18) DSM No 4026 株 (CGMCC No 0120)

0) の特性を有する微生物、ならびにその機能的均等物、継代培養物、突然変異体および変異体

(19) 特許請求の範囲第1項から第8項までのいずれか一つに記載の方法によつて製造された2-ケト-L-グルロン酸を出発原料として使用することを特徴とするアスコルビン酸の製造方法

BEST AVAILABLE COPY

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number :

64-034293

(43)Date of publication of application : 03.02.1989

(51)Int.Cl.

C12P 7/60
C12N 1/20
C12P 41/00
/(C12P 7/60
C12R 1:01)
(C12P 7/60
C12R 1:11)
(C12N 1/20
C12R 1:01
C12R 1:11)
(C12P 41/00
C12R 1:01
C12R 1:11)

(21)Application number : 63-027374

(71)Applicant : INST MICROBIOLOG ACAD
SINICA

(22)Date of filing : 08.02.1988

(72)Inventor : YIN GUANGLIN
TAO ZENGXIN
YAN ZI ZHENG
NING WENZHU
WANG CHANGHUI
WANG SHUIDING

(30)Priority

Priority number : 87 87100547 Priority date : 07.02.1987 Priority country : CN
87 87810169 23.02.1987

EP

(54) FERMENTATION PROCESS

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain 2-keto-L-gulonic acid in a good yield by using the mixture culture product of *Gluconobacter oxydans* (GLO strain) with *Bacillus megaterium* (BAM strain).

CONSTITUTION: This method for fermentation comprises mixing GLO strain having an average cell diameter of 0.3-0.6 μ m and an average cell length of 0.9-1.6 μ m with BAM strain having an average cell diameter of 1-1.5 μ m and an average cell length of 2-5 μ m so as to give a colony weight ratio of (10-300):1, culturing the mixture in a culture medium containing a yeast extract, etc., aerobically culturing the mixture culture product in an aqueous culture medium containing 20-200g/L of L-sorbose, glucose, peptone, MgSO₄, etc., at a pH of 5-8 at a temperature of 25-35°C for 0.5-10 days, subjecting the culture product to a treatment such as an adsorption treatment, and subsequently purifying the product by chromatography, etc., to obtain ≥ 40 g/L of 2-keto-L-gulonic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office